



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

바이러스 언코팅 조절인자로서
인터페론 반응 조절 단백질
STING의 기능 연구

2020년 8월

서울대학교 대학원

생명과학부

박 서 우

바이러스 언코팅 조절인자로서 인 터페론 반응 조절 단백질 STING의 기능 연구

지도교수 안광석

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2020년 6월

서울대학교 대학원

생명과학부

박 서 우

박서우의 석사 학위논문을 인준함

2020년 6월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국 문 초 록

바이러스 감염주기에서 바이러스의 유전체가 바이러스 캡시드 내부에서 숙주세포로 전달되는 것은 매우 중요한 과정이며 이 과정을 바이러스 언코팅 과정이라고 부른다. 이 언코팅 과정이 잘 이루어지지 않으면 바이러스 유전자들의 발현이 정상적으로 이루어지지 않게 되고 그 결과 후손 바이러스 생산이 저해된다. 따라서 바이러스 언코팅 과정에 대해 잘 이해하고 있다면, 바이러스 감염예방법을 개발하는 과정에 좋은 정보가 될 것이다. 우리 연구실에서 허피스바이러스에서 인터페론 반응조절 단백질인 STING(Stimulator of interferon gene)이 허피스바이러스 감염 초기 단계에서 허피스바이러스의 언코팅 과정을 조절하는 조절인자라는 것을 규명하였다. 일반적으로 STING은 세포에 이중가닥 DNA 자극이 왔을 경우 인터페론 반응을 조절하는 항 바이러스성 단백질로 잘 알려져 있으나, STING이 바이러스 감염 초기에는 친 바이러스성을 보인다는 연구결과보고도 있었다. 우리 연구실에서는 STING의 이 친 바이러스성이 바이러스 언코팅 과정을 조절함으로서 이루어질 수 있다는 것을 보였고 언코팅 조절인자로서 STING은 새로운 발견이었다. 그렇기 때문에 STING의 언코팅 조절인자로서 기능이 다른 바이러스 감염상황에서도 일어나는 지 확인해보고자 했고, 여러 가지 바이러스들 중에서 세계적으로 만성감염으로 문제를 일으키고 있는 바이러스인 인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)와 인간 B형 간염바이러스(human hepatitis B virus, HBV)에서 STING이 언코팅 과정 조절인자로서 기능할 수 있는지 확인해보았다. 연구결과 HIV에서는 STING이 나아웃되어도 HIV의 감염성과 HIV 상보적DNA의 핵 침입과정에서 차이를 보이지 않았고, HBV에서도 HBV 초기 감염 상황에서 HBV 유전자

발현양과 HBV DNA의 핵 침입과정에서 유의미한 차이를 보이지 않았다. 따라서 STING의 바이러스 언코팅 과정을 조절하는 조절인자로서 친 바이러스성은 HIV와 HBV 감염 상황에서는 보이지 않는다는 것을 본 연구를 통해 밝혔다. 이 연구결과를 바탕으로 바이러스 언코팅 과정 조절인자로서 STING의 범용성에 대한 평가를 할 수 있을 것이고, 이를 바탕으로 바이러스 감염예방법을 개발하는 것에 참고할 수 있는 정보가 될 것이다.

주요어: 바이러스 언코팅, HIV, HBV, STING

학 번: 2017-29455

목 차

I. 서론

1. 언코팅 과정 조절인자로서 STING 6
2. 인간면역결핍바이러스와 인간 B형 간염바이러스 7
3. 연구목표 9

II. 실험방법 및 재료

1. 시약과 항체 10
2. 세포 주와 바이러스 10
3. CRISPR-Cas9 낙아웃 세포 주 제작 11
4. 바이러스 감염 12
5. RNA 간섭 13
6. 웨스턴 블롯 13
7. 실시간연쇄중합반응 14
8. Alu-PCR 16
9. 초원심세포분획법 16
10. 통계학적 분석 17

III. 결과

1. 인간면역결핍바이러스 언코팅 과정에는 STING이 관여하지 않는다. 18
2. 인간 B형 간염바이러스 언코팅 과정에는 STING이 관여하지 않는다. 21

IV. 토의 25

V. 참고문헌 50

I. 서론

1. 엔코팅 과정 조절인자로서 STING

바이러스가 세포를 감염하는 과정인 바이러스 감염주기에 대한 연구는 비교적 많은 관심을 받고 있고 이러한 연구의 대다수는 바이러스가 세포막을 통해 세포질로 들어오는 과정에 주로 초점을 두고 있다(Wu, Oberstein et al. 2018, E, Meraner et al. 2019, Herrscher, Pastor et al. 2020). 그러나 DNA 바이러스와 같은 DNA를 사용하는 많은 바이러스들은 그들의 유전체가 세포질에 들어오는 것뿐만 아닌 바이러스 캡시드 단백질 안에서 세포핵으로 이동하는 과정까지 이루어져야 정상적인 바이러스의 성장이 이루어질 수 있다(Fay and Panté 2015). 이렇게 바이러스 캡시드 단백질 안에 있는 DNA를 숙주세포의 핵으로 이동되는 과정을 바이러스 엔코팅이라고 부른다(Kilcher and Mercer 2015). 이 과정에 대한 관심과 이해는 기본적으로 있는 상황이지만, 아직 엔코팅 과정을 조절하는 인자에 대해서는 많은 연구가 진행되어 있지 않다.

엔코팅 과정을 통해 바이러스 유전체를 숙주세포 핵으로 옮기는 바이러스들 중 헤르페스바이러스와 같이 잠복감염을 하는 바이러스들이 많이 포함되어 있고, 이러한 바이러스들의 잠복감염과 같은 현상을 막기 위한 방법을 개발하기 위해서는 엔코팅 과정에 대한 연구를 통한 통찰과 이해가 필요할 것이다(Fay and Panté 2015, Kilcher and Mercer 2015). 따라서 바이러스들이 자신의 유전체를 숙주에 노출시키는 엔코팅을 조절할 수 있는 인자를 찾는 것은 의미가 있는 일이며, 지속적인 연구가 필요하

다.

우리 연구실에서는 이 언코팅 과정에 관심이 있어서 허피스바이러스 감염 시 이를 조절하는 인자에 대해서 연구를 했었고, 연구 결과 허피스 바이러스 언코팅 과정 조절인자로 규명한 물질이 stimulator of interferon genes(STING)이라는 단백질이다. STING의 경우 일반적으로 DNA 자극이 왔을 때 면역 인자인 인터페론 발현을 유도하는 항 바이러스성 인자라는 것으로 알려져 있는데(Ishikawa, Ma et al. 2009, Zevini, Olganier et al. 2017), 다른 일부 연구들에서는 바이러스 감염 상황에서 STING의 친 바이러스성 기능에 대한 보고가 이루어진 적이 있다(Kalamvoki and Roizman 2014, Stempel, Chan et al. 2019). 우리 연구실에서는 이런 연구보고들에 관심을 가지고 허피스바이러스에서 연구를 진행한 결과 허피스바이러스 초기 감염에는 STING이 언코팅 과정을 도와주는 친 바이러스성 인자라는 것을 규명했다. 따라서 STING의 언코팅 과정을 조절하는 친 바이러스성 기능이 다른 바이러스 감염에서도 관찰되는 지 확인하기 위해서 본 연구를 진행했다.

2. 인간면역결핍바이러스와 인간 B형 간염바이러스

내가 이번 연구에 모델로 사용하고자 하는 바이러스인 인간면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)와 인간 B형 간염바이러스(human hepatitis B virus, HBV)는 모두 바이러스 유래 DNA를 핵으로 보내야 하면서, 전세계적으로 잠복감염 문제를 일으키는 바이러스들이기 때문에 많은 관심을 받고 있다(Winer and Ploss 2015, Lusic and Siliciano 2017, Ndung'u, McCune et al. 2019). HIV와 같은 경우에는

언코팅 과정에 대해 비교적 연구가 진행이 되어 있지만 아직 논란이 되고 있는 사항들이 많이 있고 아직 조절인자에 대한 이해가 부족한 상황이다(Campbell and Hope 2015, Fernandez, Machado et al. 2019). HBV와 같은 경우에는 언코팅 과정을 조절하는 인자에 대해서는 거의 알려진 것이 없는 상황이다. 따라서 HIV와 HBV 언코팅 과정 조절인자를 발굴하는 것은 중요한 일이다.

HIV는 RNA 바이러스이지만, (그림 1)에서 볼 수 있듯 세포질에서 바이러스 캡시드 단백질 내부에 있던 RNA 유전체가 cDNA로 역전사가 일어나게 되고 이 역전사 된 cDNA가 바이러스 캡시드 단백질 밖으로 나와서 핵으로 이동하게 된다(Campbell and Hope 2015). 이렇게 핵으로 이동한 HIV 상보적DNA는 숙주의 유전체에 통합되어 들어가서 바이러스 유전자를 발현하거나, 통합되지 못한 HIV 상보적DNA들은 숙주의 DNA 수리체계에 의해서 분해되거나 2-LTR(long terminal repeat) circle과 같은 부산물을 만들게 된다(Lusic and Siliciano 2017). 따라서 언코팅 과정이 정상적으로 이루어지지 않으면 2-LTR circle 수준이나, HIV 유전자 발현양과 같은 것들이 달라지게 될 것이다.

HBV는 DNA 바이러스로 허피스바이러스와 마찬가지로 바이러스 캡시드 단백질 안에 있는 바이러스 DNA를 핵으로 운반해야 한다(Megahed, Zhou et al. 2020). 이 과정에서 허피스바이러스와 약간 차이가 있는데, 허피스바이러스는 캡시드 단백질이 핵막 밖에 위치해서 캡시드 단백질이 핵공과 결합한 이후에 바이러스 DNA가 캡시드 단백질에서 핵으로 이동한다(Ojala, Sodeik et al. 2000). 그러나 HBV는 캡시드 단백질이 핵공 내부에 들어간 이후에 캡시드 단백질이 분해가 되면서 바이러스 DNA가 캡시드 단백질에서 핵으로 이동하게 된다(Rabe, Vlachou et al. 2003). 그 이후 캡시드에서 나온 roughly circular DNA(rcDNA)

가 핵 내부에서 covalently closed circular DNA(cccDNA) 형태로 바뀌게 되고 이 cccDNA를 주형으로 인간 B형 간염바이러스 유전자들의 전사가 일어나게 된다(Megahed, Zhou et al. 2020) (그림 2). 따라서 HBV 유전자발현이나 HBV DNA의 핵으로 이동된 정도가 HBV 언코팅 과정에 의해 영향을 받을 수 있다.

3. 연구목표

바이러스 언코팅 과정은 바이러스 감염주기에서 바이러스의 감염성을 결정하는 중요한 단계 중 하나이다. 하지만 바이러스 감염주기의 다른 단계들에 비해서 언코팅 과정에 대한 연구는 비교적 많이 이루어지지 않았다. 그리고 바이러스 언코팅 과정 조절인자들은 여러 바이러스 감염 상황에서 언코팅 과정을 조절하는 경우도 알려져 있으므로, 이번 연구에서는 우리 연구실에서 규명한 허피스바이러스 언코팅 과정 조절인자인 STING이 다른 바이러스 감염과정에서도 그 기능을 유지하고 있는지 조사하고자 했다.

이를 조사하기 위해서 STING 발현이 CRISPR-Cas9이나 siRNA를 통해서 억제된 세포에서 HIV나 HBV 감염에서 생성되는 바이러스 생성물의 양을 비교함으로써 STING이 이 바이러스들이 감염된 상황에서 언코팅 과정 조절인자로서 기능을 하고 있는지 알아보고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시약과 항체

polyethylene glycol 8000 (PEG8000)과 poly I:C, poly dA:dT를 Sigma에서 구입해서 실험에 사용했다. 그리고 트랜스펙션 매개체인 lipofectamine 2000과 PEI는 Thermo Fisher와 polyscience에서 각각 구입해서 사용했다. 웨스턴 블롯 실험에서 사용한 항 Calnexin 항체와 항 STING 항체는 Cell signaling에서, 항 HSC70 항체는 Santa Cruz, 항 Tubulin 항체는 Abfrontier, 항 Histone H3 항체는 Abcam에서 구입하여 실험에 사용했다.

2. 세포 주와 바이러스

HEK293T, Hela 세포는 ATCC에서 구입해서 사용했고, HepG2-NTCP, HepAD38 세포는 아주대학교 김경민 교수님에게 받아서 사용했다. 모든 세포들은 37 °C, 5% CO₂ 세포배양기에서 10% fetal bovine serum(HyClone FBS: Thermo Fisher), 2 mM GlutaMAX-I, 50 U/ml penicillin, 그리고 50 µg/ml Streptomycin(Invitrogen)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's media(HyClone DMEM: Thermo Fisher)에서 배양되었다.

HIV를 얻는 과정은 다음과 같다. 10 cm 세포배양접시에 깔린

HEK293T 세포에 HIV-1-GFP 10 μ g과 HCMV-VSV-G 2 μ g을 PEI를 이용하여 트랜스펙션을 진행했다. 트랜스펙션 후 48시간 뒤에 상층액을 모두 모아서 0.45 μ m 필터에서 여과를 한 다음, Lenti-X-concentrator(TAKARA)를 매뉴얼에서 제시한 방법대로 진행해서 바이러스 펠렛을 만들었다. 이 펠렛을 다시 세포배양액에서 풀어주어서 실험에 사용했다.

HBV를 얻는 과정은 다음과 같다. HepAD38세포에서 상층액만 분리하고 이 상층액을 1,500 rpm으로 10분동안 원심분리를 진행해서 세포부유물을 제거해준다. 그 이후 4% PEG8000이 되도록 20% PEG8000 PBS 용액을 세포부유물을 제거해준 상층액에 섞어준 다음 4 $^{\circ}$ C에서 16시간동안 배양해준다. 배양해준 용액을 4 $^{\circ}$ C, 40,000g로 30분동안 원심분리를 진행해서 바이러스 펠렛을 만들어주고, 이 펠렛을 다시 세포배양액에서 풀어준 뒤 실험에 사용했다.

3. CRISPR-Cas9 낙아웃 세포 주 제작

CRISPR-Cas9 유전체 편집 기술을 이용하여 Hela 세포와 HepG2-NTCP 세포에서 STING 낙아웃 세포 주를 제작했다. STING의 번역부위를 표적하는 single guide RNA(sgRNA) 서열을 [표 1]과 같이 제작하여 lentiviral CRISPR-Cas9 V2 벡터에 삽입했고, 이를 HEK293T 세포에 트랜스펙션을 진행했다. 48시간 뒤에 렌티바이러스가 포함되어있는 상층액을 모아서 lenti-X-concentrator를 이용해서 바이러스를 수확하고 이 수확한 바이러스를 이용해서 Hela 세포와 HepG2-NTCP 세포에 감염시켜 주었다. 바이러스 감염 후 2일 뒤 Hygromycin B 선별을 진행

하였으며, Hela 세포와 같은 경우는 4일, HepG2-NTCP 세포와 같은 경우는 10일동안 진행했다. 이렇게 STING이 낙아웃된 세포들은 웨스턴 블롯 등과 같은 방법을 통해서 STING의 발현 여부를 확인하였다.

[표 1] CRISPR-Cas9 낙아웃에 이용한 sgRNA 서열

Guide RNA 이름	서열 (5' -3')
sgSTING #7 forward	CAC CGC CCG TGT CCC AGG GGT CAC G
sgSTING #7 reverse	CAC CGC CCG TGT CCC AGG GGT CAC G
sgSTING #8 forward	CAC CGG TGA CCC CTG GGA CAC GGG A
sgSTING #8 reverse	AAA CTC CCG TGT CCC AGG GGT CAC C

4. 바이러스 감염

인간면역결핍바이러스(HIV-1-GFP)를 Hela 세포에 감염할 때 8 ng/10000 cell의 비율로 바이러스 혼합용액을 만들어서, 이산화탄소 세포배양기에서 5 % CO₂, 37 °C 조건에서 2시간동안 배양을 한 뒤 세포배양액을 교체해주고 지정된 시간만큼 배양을 진행하였다.

HBV를 HepG2-NTCP 세포에 감염할 때 4% PEG8000 세포 배양액에 바이러스를 지정된 양이 들어가도록 바이러스 혼합액을 만들어주어 세포에 처리를 해주었다. 그 이후 이산화탄소 세포배양기에서 5 % CO₂, 37 °C 조건에서 16시간동안 배양을 한 뒤 세포배양액을 교체해주고 3~4시간 뒤에 표본을 채취했다.

5. RNA간섭

siRNA는 Dharmacon에서 서로 다른 네 가지 종류의 siRNA가 섞인 상태로 구입해서 사용했다. 이 때 주문해서 수령한 siRNA를 이용해서 20 nM 농도로 siRNA를 Dharmafect 1을 이용해서 트랜스펙션을 진행하였고, Hela 세포에서는 2일 뒤에, HepG2-NTCP 세포에서는 3일 뒤에 다음 실험을 진행하였다.

6. 웨스턴 블롯

PBS로 세포를 두 번 씻어준 다음 RIPA 용액에 PMSF와 Leupeptin(Sigma)를 넣은 완충용액으로 4 °C에서 15분동안 반응시켜서 세포를 용해시켰다. 이 용해액을 4 °C에서 16,000 rpm으로 5 분간 원심분리 시킨 뒤 상층액만 분리하였다. 이 상층액에 SDS sample buffer를 첨가한 후 98 °C에서 10분간 끓였다. 이 샘플들을 이용해서 SDS-PAGE를 통해 크기 별로 분리하였고, 50 V에서 2시간동안 니트로셀룰로스 막으로 이동시켰다. 이 니트로셀룰로스 막은 5% 탈지분유 혼합액으로 1시간동안 블로킹하였고, 표시된 1차항체를 1:1000으로 4 °C에서 16 시간동안 반응시켰다. 그 후 0.1% Tris buffered saline with TritonX-100(TBST)로 씻어주고, 그 후 HRP가 부착되어 있는 2차항체를 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 다시 0.1% TBST로 니트로셀룰로스 막을 씻어주고 ECL 검출 시약을 이용하여 관찰했다.

7. 실시간연쇄증합반응

지정된 바이러스 감염시간 뒤에 DNA는 QIAGEN Blood Mini kit로 분리하여서 실험에 사용했다. 그리고 RNA도 마찬가지로 지정된 바이러스 감염시간 뒤에 RNA를 Trizol(Sigma)을 이용하여 세포 내 RNA를 추출했고, 이후 정제된 RNA를 ReverTra ACE qPCR RT kit(TOYOBO)로 역전사하여 상보적DNA를 합성하였다. 이 DNA와 상보적DNA는 SYBR Green kit(Enzynomics)를 이용하여 실시간연쇄증합반응을 진행하였다. 이 때 사용한 프라이머는 [표 2]과 같다.

[표 2] 실시간연쇄중합반응 프라이머 서열

표적 유전자	방향	서열(5' -3')
GAPDH(RNA)	정방향	GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G
	역방향	ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCA A
STING	정방향	GAG CAG GCC AAA CTC TTC TG
	역방향	TGC CCA CAG TAA CCT CTT CC
3.5 kb RNA	정방향	GAG TGT GGA TTC GCA CTC C
	역방향	GAG GCG AGG GAG TTC TTC T
IFN β	정방향	AGT AGG CGA CAC TGT TCG TG
	역방향	AFC CTC CCA TTC AAT TGC CA
ISG15	정방향	AGA TCA CCC AGA AGA TCG
	역방향	TGT TAT TCC TCA CCA GGA TG
GAPDH(DNA)	정방향	CAA TTC CCC ATC TCA GTC GT
	역방향	TAG TAG CCG GGC CCT ACT TT
R/U5	정방향	GCC TCA ATA AAG CTT GCC TTG A
	역방향	TGA CTA AAA GGG TCT GAG GGA TCT
U5/psi	정방향	TGT GTG CCC GTC TGT TGT GT
	역방향	GAG TCC TGC GTC GAG AGA TC
2-LTR	정방향	AAC TAG GGA ACC CAC TGC TTA AG
	역방향	TCC ACA GAT CAA GGA TAT CTT GTC
β -globin	정방향	GAT CTG TCC ACT CCT GAT GC
	역방향	AGC TTG TCA CAG TGC AGC TC
HBV DNA	정방향	GAG TGT GGA TTC GCA CTC C
	역방향	GAG GCG AGG GAG TTC TTC T

8. Alu-PCR

인간면역결핍바이러스가 감염된 세포에서 인간면역결핍바이러스의 상보적DNA가 어느정도 수준으로 숙주 유전체에 통합되어 들어갔는지 알아보기 위한 실험으로 그 과정은 예전에 진행되었던 연구와 동일하게 진행하였고, 이 때 사용한 프라이머 서열은 [표 3]와 같다(Brussel and Sonigo 2003).

[표 3] Alu-PCR 프라이머 서열

표적유전자	서열 (5' -3')
L-M667	ATGCCACGTAAGCGAACTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTG
<i>Alu</i> 1	TCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAGG
<i>Alu</i> 2	GCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAG
Lambda T	ATGCCACGTAAGCGAACT
AA55M	GCTAGAGATTTTCCACACTGACTAA

9. 초원심세포분획법

Subcellular protein fractionation kit for cultured cells를 Thermo Fisher에서 구입하여 사용했다. 실험 과정은 매뉴얼에서 제시한 것에서 약간 변형해서 진행했다. 세포질 분획 용액만 150 mM NaCl, 50 mM HEPES(pH 7.4), 150 μ g/ml digitonin에 단백질 분해 억제제를 첨가해서 사용했고, 나머지는 키트에 있는 구성품을 키트에서 제시하고 있는 매뉴얼대로 사용했다.

10. 통계학적 분석

Prism version 5.0 software (GraphPad Software)를 이용했다. 모든 값은 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 으로 표현되었고, Two-way ANOVA 방법을 통해 $P < 0.05$ 에서 차이의 중요도를 결정하였다.

III. 결과

1. 인간면역결핍바이러스 언코팅 과정에는 STING이 관여하지 않는다.

HIV 감염에서 STING이 언코팅 조절 인자로서 기능을 하는 지 조사하기 위해서 CRISPR-Cas9을 이용해서 STING 녹아웃 Hela 세포를 제작하는 과정을 진행했다. Hygromycin B 선별이 끝난 Hela 세포들을 이용해서 웨스턴 블롯을 진행했고, 이를 통해 STING 녹아웃 Hela 세포에서 STING이 단백질 수준에서 발현이 잘 억제되어 있다는 것을 확인했다(그림 3A). 단백질 수준에서 발현이 잘 억제되어 있는 것을 확인한 STING 녹아웃 Hela 세포에서 DNA 복합체인 poly dA:dT와 RNA 복합체인 poly I:C를 처리하고, 제 1형 인터페론인 IFN- β 와 인터페론에 의해 발현이 조절되는 유전자인 ISG15의 mRNA 발현 수준을 실시간중합연쇄반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 통해서 비교해보았다(그림 3B). 이 결과에서 STING의 발현이 억제되어 있으면 IFN- β 와 ISG15의 mRNA 발현 수준이 모두 낮아진다는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과들을 통해서 STING 녹아웃 Hela 세포가 잘 제작되었다는 것을 확인했다.

STING이 만약 HIV 언코팅 과정 조절 인자로서 기능을 한다면, STING 유무에 따라서 HIV 감염성에서 차이가 나타날 것이다. 따라서 STING 녹아웃 Hela 세포를 이용해서 HIV 감염성에 STING이 주는 영향에 대해서 조사하기 위해, 형광이용세포분류기(fluorescence

activated cell sorter, FACS) 분석을 진행했다. 형광이용세포분류기 분석을 위해 HIV에 감염된 Hela 세포 표본을 만들 때 두 가지 경우를 생각했는데 하나는 HIV의 감염량에 변화를 주는 것이고, 나머지 하나는 HIV에 감염된 이후 지난 시간에 변화를 주는 것이다.

먼저 다양한 HIV 감염량으로 HIV를 Hela 세포에 감염시키고 2일 뒤에 형광이용세포분류기 분석을 진행했다. 그 결과 STING 낙아웃 Hela 세포와 대조군 Hela 세포에서 HIV 감염성에는 차이가 없는 것을 확인했다(그림 4). 따라서 HIV 감염량이 달라지더라도 STING 유무에 따른 HIV 감염성에서 차이가 없다는 것을 알 수 있다. 다음으로 STING 낙아웃 Hela 세포와 그 대조군 Hela 세포에 동일한 감염량의 HIV를 감염시키고, 감염 후 다양한 시간대에서 얻은 세포를 이용해 형광이용세포분류기 분석을 진행했다. 그 결과 모든 시간대에서 STING 낙아웃 Hela 세포와 대조군 Hela 세포에서 큰 차이가 없다는 것을 확인할 수 있다(그림 5). 따라서 HIV 감염 후 시간대에 따른 HIV의 감염성은 STING 유무에 의해 영향을 받지 않는다는 것 볼 수 있다. 이런 결과들로 미루어 보았을 때 HIV 감염 상황에서 STING은 HIV의 감염성에는 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있다.

위의 결과들을 통해서 STING이 HIV 감염성에는 영향을 주지 않는다는 것을 관찰했지만, STING이 항 바이러스성 인자로 잘 알려져 있고 그렇기 때문에 적은 양의 HIV 상보적DNA가 세포핵으로 들어와도 항 바이러스성 반응이 적어서 감염성에서는 큰 차이가 나타나지 않을 가능성도 고려해야한다고 생각했다. 따라서 STING 유무에 따른 HIV 상보적 DNA의 세포핵으로 이동량 변화를 확인했다. 이를 확인하기 위해서 HIV 역전사 산물들의 비율을 비교해서 HIV의 역전사 과정까지는 차이가 있는지 없는지를 관찰하고자 했다. 그 이후 핵으로 들어온 HIV 역전

사 산물 중 세포 유전체로 들어가지 못한 2-LTR circle수준을 실시간 중합연쇄반응과정으로 비교하고, 유전체로 들어간 HIV 역전사 산물은 Alu-PCR이라는 방법을 통해서 비교했다(Brusseel and Sonigo 2003).

먼저 STING 낙아웃 Hela 세포와 대조군 Hela 세포에 동일한 양의 HIV를 감염시키고 HIV 역전사 산물의 양을 비교해보았을 때, STING 유무와는 관계없이 그 양에는 유의미한 차이가 없다는 것을 관찰했다(그림 6A). 이를 통해 HIV가 세포로 들어와서 역전사가 일어나는 과정까지는 STING이 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있다. 2-LTR circle수준과 Alu-PCR결과를 HIV가 감염된 STING 낙아웃 Hela 세포와 대조군 Hela 세포 사이에서 비교를 해보았을 때, HIV 역전사 산물을 비교했을 때와 마찬가지로 서로 유의미한 차이가 없다는 것을 볼 수 있다(그림 6B). 따라서 STING은 HIV 상보적DNA의 세포핵 이동과정에도 영향을 주지 않는다고 결론 내렸다.

STING이 만약 HIV 언코팅 과정을 조절하는 조절인자라면 STING 유무에 따라서 감염성이나 HIV 유전체의 세포핵 이동에 변화가 있어야한다. 그러나 STING 유무에 따른 HIV 감염성과 HIV 상보적DNA의 세포핵 이동을 비교해보았을 때 모두 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. 따라서 STING은 HIV 언코팅 과정을 조절하는 조절인자가 아니라는 것을 알 수 있다.

2. 인간 B형 간염바이러스 언코팅 과정에는 STING이 관여하지 않는다.

HBV 언코팅 조절인자로서 STING이 기능을 하는 지 알아보기 위해서 먼저 HBV 감염 모델이 정상적으로 기능을 하는 지 확인했다. 이를 확인하기 위해서 HBV 감염 모델로 사용되는 HepG2-NTCP 세포에 다양한 감염량의 HBV를 감염시켜서 감염량에 비례하게 HBV DNA 수준이나 HBV 유전자 발현 수준이 달라지는 지 실시간중합연쇄반응을 통해 확인했다. 실시간중합연쇄반응 결과를 보니 HBV DNA 수준이나 HBV 유전자 발현 수준이 HBV 감염량에 비례해서 증가한다는 것을 관찰할 수 있었다(그림 7). 따라서 내가 쓰고자 하는 HBV 감염 모델이 실험에 사용하기에 적절하다는 것을 확인했다.

HBV 언코팅 과정에 STING이 조절인자로서 기능을 하는 지 조사하기 위해서, HBV 감염 모델인 HepG2-NTCP 세포에서 CRISPR-Cas9을 이용해 STING 녹아웃 세포를 제작했다. Hygromycin B 선별을 끝낸 HepG2-NTCP 세포를 이용해서 웨스턴 블롯을 진행했고, 이를 통해 STING 녹아웃 HepG2-NTCP 세포에서 STING의 발현이 단백질 수준에서 잘 억제되고 있다는 것을 확인할 수 있다(그림 8A). 이렇게 확인한 STING 녹아웃 HepG2-NTCP 세포를 이용해서 동일한 감염량의 HBV를 감염시켰을 때 세포 안에 동일한 양의 HBV DNA가 존재하는 것을 실시간중합연쇄반응 실험을 통해서 확인하였다(그림 8B). 따라서 STING은 언코팅 과정이 일어나기 전 HBV 세포 침입 단계에 영향을 주는 것은 아니라는 것을 알 수 있다.

STING이 HBV 언코팅 과정을 조절하는 조절인자라면 핵 내부로 침투

하는 HBV DNA양이 달라질 것이기 때문에, 감염 초기 HBV 유전자 발현양에서 차이가 날 것이라고 생각했다. 따라서 STING이 언코팅 과정 이전인 HBV 세포 침입 단계까지는 영향을 주지 않는 것을 앞에서 확인했으니, HBV 감염 초기에 STING 유무에 따라 HBV 유전자 발현양에서 차이가 난다면 STING이 언코팅 과정을 조절한다고 생각할 수 있을 것이다. 이를 확인하기 위해서 STING 녹아웃 HepG2-NTCP 세포와 대조군 HepG2-NTCP 세포에 동일한 조건으로 HBV 감염을 진행했고, 감염 뒤 1일 뒤에 표본을 얻어서 HBV 3.5 kb RNA의 발현 수준을 비교했다. 이 때 결과를 보면, HBV 감염 초기에 HBV 3.5 kb RNA의 발현 수준은 STING 녹아웃 HepG2-NTCP 세포와 대조군 HepG2-NTCP 세포에서 큰 차이를 보이지 않는 것을 관찰할 수 있다(그림 9). 따라서 HBV 감염 초기 HBV 3.5 kb RNA 발현 수준은 STING에 의해서 영향을 받지 않는다는 것을 알 수 있다.

HIV 때와 마찬가지로 STING은 항 바이러스 인자로 먼저 잘 알려진 단백질이므로, HBV DNA는 핵으로 이동되는 양이 감소했지만 그 DNA에서 발현되는 HBV 유전자 발현양이 증가해서 큰 차이가 보이지 않았을 가능성도 배제할 수는 없었다. 이를 확인하기 위해서 HIV와는 다르게 초원심세포분획법(subcellular fractionation)을 이용해서 HBV가 감염된 세포에서 핵을 분리하고 그 핵에서 HBV DNA와 숙주 유전체의 비율을 실시간중합연쇄반응 방법으로 비교해보았다. 먼저 초원심세포분획법을 통해 STING 녹아웃 HepG2-NTCP와 대조군 HepG2-NTCP가 잘 분획 되었는지 확인하기 위해서, 각각 분획 된 부분들의 일부를 이용해서 웨스턴 블롯을 진행했다(그림 10A). 이 때 결과를 보면 세 개의 표본들 모두 큰 문제 없이 분획 되었다는 것을 확인할 수 있었고, 이 때 남은 분리한 핵 분획의 일부와 그리고 분획하지 않은 전체 세포 표본에

서 DNA를 얻어서 실시간중합연쇄반응을 진행했다(그림 10B). 실시간 중합연쇄반응 결과를 보면, 전체 세포 표본에서 HBV DNA 수준은 STING에 의해 영향을 받지 않고 핵 분획 표본에서 HBV DNA 수준도 STING에 의해서 영향을 받지 않는 것을 확인할 수 있다. 따라서 STING은 HBV DNA가 세포핵으로 이동하는 과정에 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다.

마지막으로 CRISPR-Cas9 방법 이외의 유전자 발현 억제 방법으로도 유사한 결과를 얻는 지 확인하기 위해서 siRNA를 이용한 유전자 발현 억제 방법을 이용했다. 먼저 siRNA를 HepG2-NTCP 세포에 처리했을 때 STING의 발현이 잘 억제 되었는지 확인하기 위해서 웨스턴 블롯과 실시간중합연쇄반응을 각각 진행하였다(그림 11A). 이 때 결과들을 보면 STING의 발현양이 siRNA 처리로 인해 단백질 수준과 RNA 수준에서 모두 잘 억제되어 있는 것을 알 수 있다. 이렇게 STING의 발현이 잘 억제되어 있는 상태에서 HBV 감염 초기 HBV 3.5 kb RNA 발현양의 변화를 실시간중합연쇄반응 실험으로 확인을 했다(그림 11B). 이 결과를 보면 siRNA로 HepG2-NTCP 세포에서 STING의 발현을 억제해도 CRISPR-Cas9으로 억제한 것과 같이 HBV 3.5 kb RNA 발현양에는 영향을 주지 않는 것을 알 수 있다. 따라서 다른 실험 방법을 사용해서 STING의 발현을 억제해도 같은 결과를 얻는다는 것을 확인할 수 있다.

STING이 HBV 언코팅 과정의 조절인자라면 STING의 발현이 억제된 상황에서 HBV 감염 초기 HBV 유전자 발현이나 HBV DNA가 핵으로 이동되는 양이 달라져야 할 것이다. 이를 모두 확인하기 위해서 STING을 CRISPR-Cas9 시스템을 통해 낙아웃한 HepG2-NTCP 세포에서 실험을 진행했고, 실험 결과 STING의 발현이 정상적으로 억제되어 있어도 HBV 감염 초기 HBV 유전자 발현양상이나 HBV DNA의 핵으로

이동된 양에는 유의미한 차이가 없다는 것을 관찰했다. 이러한 결과들로 미루어 보아, STING은 HBV 언코팅 과정을 조절하는 조절인자가 아니라는 것을 알 수 있다.

IV. 토의

바이러스 언코팅 과정은 바이러스 유전체가 바이러스 캡시드 내부에서 숙주세포로 전달되는 과정이다. 이 과정은 바이러스 감염주기에서 감염성을 결정하는 중요한 단계이지만, 아직 다른 단계들에 비해서는 연구가 많이 이루어지지 않았다. 아직 연구가 많이 이루어지지 않았을 뿐 많은 관심을 받고 있는 분야이며, 이 단계를 잘 이해하는 것은 추후 바이러스 감염 예방을 위한 전략을 구축하는 것에 도움이 될 것이다.

본 연구에서는 인터페론 반응 조절단백질인 STING이 허피스바이러스 감염 상황과는 달리 HIV와 HBV 감염상황에서는 언코팅 과정 조절인자로서 기능을 하지 않는다는 것을 실시간연쇄증합반응, 형광이용세포분류기, Alu-PCR, 초원심세포분획법과 같은 다양한 실험방법들을 통해서 보였다.

HIV가 STING이 낙아웃되어 있는 Hela 세포에 감염되었을 때 그 감염성에는 큰 차이가 없다는 것을 관찰했고, 거기에 HIV 유래 생성물들의 양을 비교해봤을 때도 큰 차이가 없다는 것을 관찰했다(그림 4, 5, 6). 이 과정에서 STING이 낙아웃된 세포에서 HIV 감염 후 24시간 뒤에 감염성을 형광이용세포분류기를 통해서 확인했을 때 작지만, STING이 없는 세포에서 감염성이 조금 더 낮은 것 같은 현상을 볼 수 있었다(그림 5). 하지만 HIV의 상보적DNA가 핵으로 들어가서 생기는 생성물들의 양을 비교했을 때에도 큰 차이가 보이지 않았고, 감염 후 48시간 이후부터는 다시 감염성에 큰 차이가 보이지 않는 것으로 보아 STING은 HIV 언코팅 과정을 조절하고 있지는 않다고 결론을 지었다. 그리고 이와 유사한 현상을 다른 연구단에서 STING을 과발현한 상황에서 관찰하

었다(Trotard, Tsopoulidis et al. 2016). 하지만 그림 5에서 보이는 24 시간 때 STING 낙아웃 Hela 세포에서 관찰한 HIV 감염성 결과가 잘못된 결과가 아닐 수도 있다. 그렇지만 다른 실험에서 보았을 때 이는 언코팅 과정 때문에 생긴 결과는 아닌 것으로 생각되고, STING이 NF- κ B 신호전달체계를 조절할 수 있는 기능에서 온 결과라고 생각된다. HIV가 처음 바이러스 유전자들을 발현할 때 NF- κ B 신호전달체계를 사용한다는 보고가 있었고(Sutton, Wu et al. 1998, Quinto, Mallardo et al. 1999), STING이 이 과정에 관여할 수 있다는 것도 잘 알려져 있다(Balka, Louis et al. 2020). 따라서 추후에 STING이 HIV 감염상황에서 NF- κ B 신호전달체계를 조절함으로써 친 바이러스성 인자로 작용할 수 있는지 확인해보는 것은 후속 연구로서 꽤 많은 주제가 될 것이라고 생각한다. 이런 STING이 NF- κ B 신호전달체계를 조절해서 친 바이러스성 기능을 보인 것은 쥐 사이토메갈로바이러스(mouse cytomegalovirus, MCMV)에서도 간단하게 보고가 된 적이 있는 것이며(Stempel, Chan et al. 2019), 이를 다른 바이러스 확장해 나가는 것은 의미가 있을 것이다.

HBV가 STING이 낙아웃 된 HepG2-NTCP 세포에 감염되었을 때 바이러스 감염 초기에 생성되는 바이러스 유전자의 발현양에 큰 차이가 없다는 것을 확인하였고(그림 9), 그림 10에서 초원심세포분획법을 통해서 HBV 감염 이후에 세포핵으로 운반된 HBV DNA의 양에서도 큰 차이가 없다는 것을 확인함으로써 STING이 HBV 감염과정에서 언코팅 과정 조절인자로 기능하지 않는다는 결론을 얻게 되었다. 여기에서 HBV 감염주기에서 중요한 역할을 하는 cccDNA의 수준을 STING 낙아웃 세포에서 비교할 수 있었다면 좀 더 확실한 결과를 얻을 수 있었을 것이다. 왜냐하면 cccDNA는 HBV가 숙주 핵으로 침입하고 나서 가장 처음 생성되는 물질이며, 이 cccDNA를 주형으로 HBV의 유전자가 발현

되고, HBV의 만성감염을 유지하는데 중요한 역할을 하기도 하는 바이러스 생성물이기 때문이다(Li, Zhao et al. 2017). 하지만 STING이 언코팅 과정을 조절하는 인자였다면 HBV 유전자 발현에서 그 차이가 STING 낙아웃 세포에서 관찰되거나 HBV DNA가 핵에 존재하는 비율에서 변화가 관찰되어야 했다. 그러므로 cccDNA 수준을 통해서 관찰한 것은 아니지만, STING이 HBV 감염주기에서 언코팅 조절인자로 기능하지 않는다는 것을 보이는 것에는 크게 무리가 없을 것이다.

언코팅 과정 조절인자 중 Nup358과 같은 몇 가지 인자들은 다양한 바이러스의 언코팅 과정을 조절할 수 있다는 것이 알려져 있다(Fay and Panté 2015). 하지만 이런 인자들은 대체로 핵공과 관련 있는 물질들이었고, STING도 우리 연구실의 선행연구에 의하면 소량이지만 핵공과 관련이 있다는 것을 발견하였다. 따라서 우리는 STING이 다른 Nup358과 같이 다양한 바이러스에서 언코팅 과정 조절인자로서 기능을 할 수 있는 가능성이 높다고 생각했지만, 연구 결과 그렇지 않았다. 이런 결과를 통해 핵공과 상호작용할 수 있는 언코팅 과정 조절인자는 핵공 구성성분만큼 보편적으로 다양한 바이러스에서 언코팅 과정을 조절하는 것은 아니라는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 앞으로 언코팅 과정 조절인자에 대해서 연구할 때 그 확장성에 대해 참고할 수 있는 정보가 될 것이다.

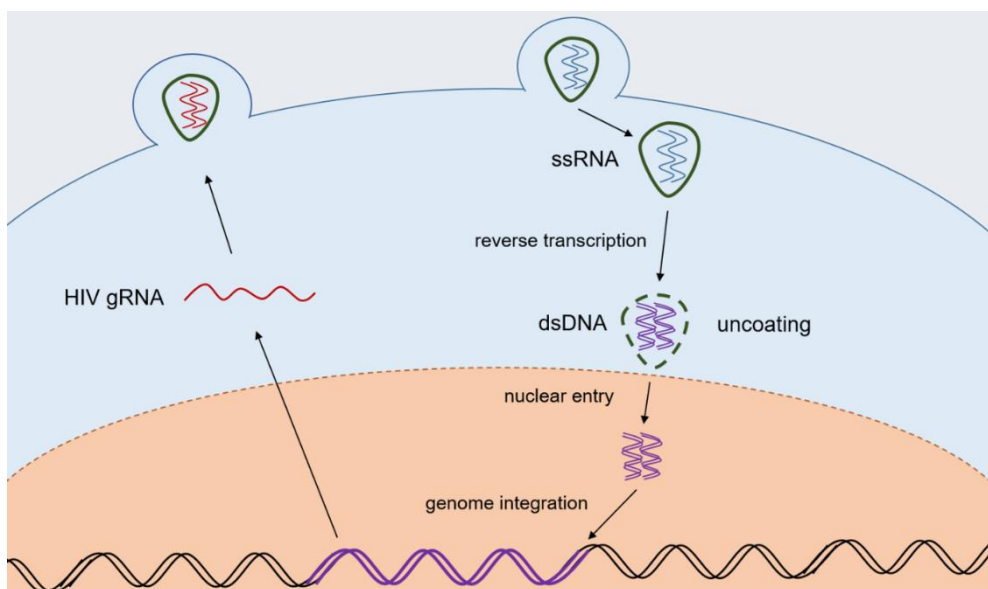


그림 1. 인간면역결핍바이러스의 생활사

인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)의 생활사를 요약한 그림이다. HIV가 숙주 안으로 침입하게 되면, 단일 가닥 RNA형태(single strand RNA, ssRNA)의 HIV 유전체가 역전사 과정(reverse transcription)을 통해서 이중 가닥 DNA형태(double strand DNA, dsDNA)로 변형이 일어나게 된다. 이 과정이 완료되고 나면 언코팅 과정을 통해서 이중 가닥 DNA가 세포 핵으로 침입하게 되고, 이 때 침입한 HIV의 이중 가닥 DNA가 세포의 유전체에 통합(genome integration)된다. 이 통합된 HIV 이중 가닥 DNA에서 HIV의 유전자들이 발현하게 되고, 이 유전자들을 통해서 새로운 HIV 바이러스들이 생성된다.

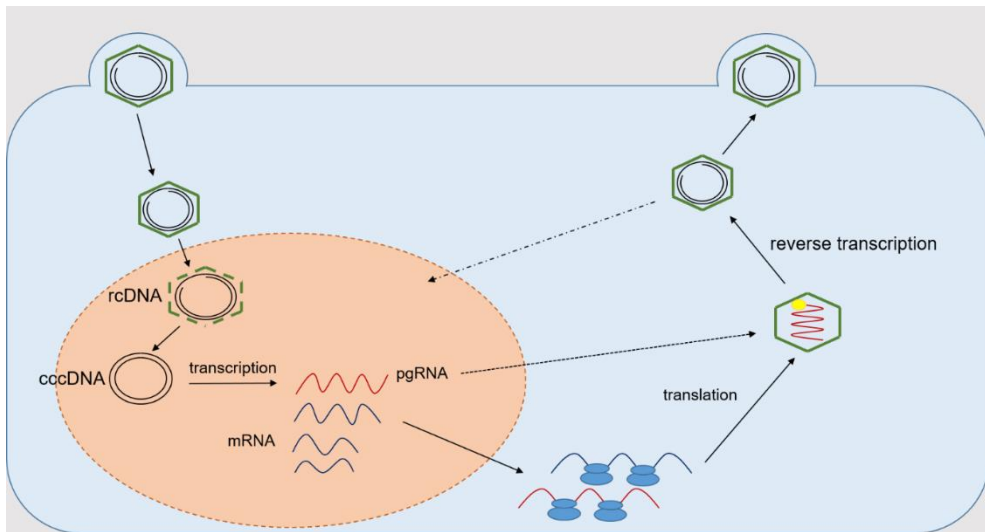


그림 2. 인간 B형 간염바이러스의 생활사

인간 B형 간염바이러스(human hepatitis B virus, HBV)의 생활사를 요약한 그림이다. 먼저 HBV가 숙주 안으로 침입하게 되면, 핵까지 바이러스 캡시드가 온전한 상태로 이동하게 된다. 핵에 도착한 HBV는 언코팅 과정을 통해서 HBV의 유전체인 roughly circular DNA(rcDNA)가 캡시드에서 나오게 된다. 이렇게 숙주 핵으로 이동하게 된 rcDNA는 숙주 환경을 이용해서 covalently closed circular DNA(cccDNA) 형태로 변형되고, 이 cccDNA를 주형으로 HBV의 유전자들이 mRNA로 전사되게 된다. 이 때 전사된 HBV mRNA들은 번역 과정을 통해서 새로운 HBV를 만드는 데 필요한 것들을 만들어 낸다. 그리고 HBV mRNA 중 하나인 pregenomic RNA(pgRNA)는 새로 만들어진 HBV 캡시드 안으로 들어가서 역전사 과정을 통해 새로운 rcDNA를 만들게 된다. 이렇게 만들어진 HBV 복합체는 세포 밖으로 나가서 새로운 숙주에 들어가거나, 아니면 숙주의 핵으로 다시 들어가서 cccDNA 수준을 유지시켜 그 숙주의 만성 감염을 유지한다.

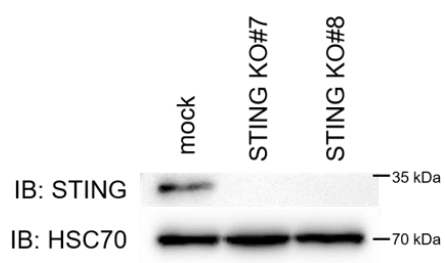
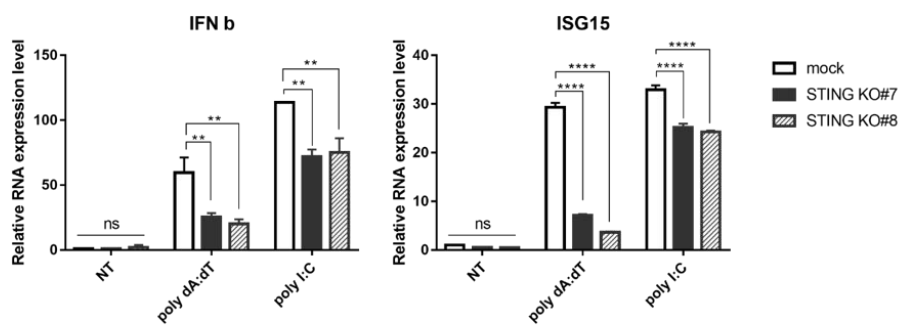
A**B**

그림 3. CRISPR-Cas9을 통한 STING 녹아웃 Hela 세포와 STING 녹아웃에 의한 IFN- β 와 ISG15 mRNA 발현 감소.

CRISPR-Cas9을 이용해서 STING 녹아웃 Hela 세포를 제작하였고, 이 때 만든 STING 녹아웃 Hela 세포를 사용해서 DNA 합성체인 poly dA:dT와 RNA 합성체인 poly I:C 자극을 주었을 때 반응이 어떻게 달라지는 지를 관찰하였다.

(A) Hela 세포에서 STING이 잘 녹아웃된 것을 웨스턴 블롯 방법으로 단백질 수준에서 확인하였다.

(B) DNA 합성체인 poly dA:dT와 RNA 합성체인 poly I:C 자극이 STING 녹아웃 Hela 세포에 주어진 후 4시간 뒤에 RNA를 분리해서, IFN- β 와 ISG15의 RNA 발현량을 실시간연쇄중합반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)으로 분석한 결과이다. 세 번의 독립적인 실험결과를 Prism version 5.0 software(GraphPad Software)를 이용해 분석했다. 모든 값은 mean \pm SEM으로 표현되었고, Two-way ANOVA 방법을 통해 $P < 0.05$ 에서 차이의 중요도를 결정하였다

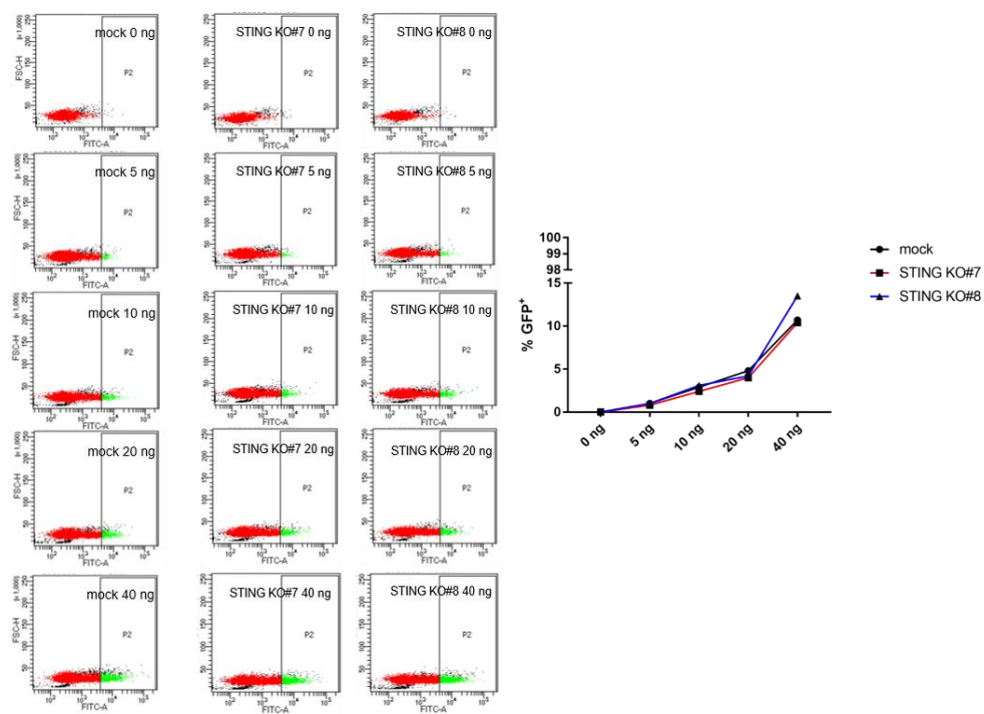


그림 4. STING은 인간면역결핍바이러스 감염량이 변해도 그 감염성에는 영향을 주지 않는 것을 확인.

인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)의 감염성이 STING에 의해서 조절되는 지 확인하기 위해 HIV의 감염량을 다양하게 바꾸어서 HIV 감염을 진행했고, 그 감염성을 형광이용세포분류기(fluorescence activated cell sorter, FACS)를 이용해서 분석하였다. 왼쪽 그래프는 STING 녹아웃 Hela 세포와 그 대조군 Hela 세포가 6 well plate에 3×10^5 개의 세포가 깔려 있는 상태에서 HIV가 5, 10, 20, 40 ng씩 감염되고 2일 뒤 Hela 세포들의 FACS 분석결과이다. 오른쪽 그래프는 왼쪽에서 얻은 FACS 결과를 막대 그래프로 정리한 그림이다.

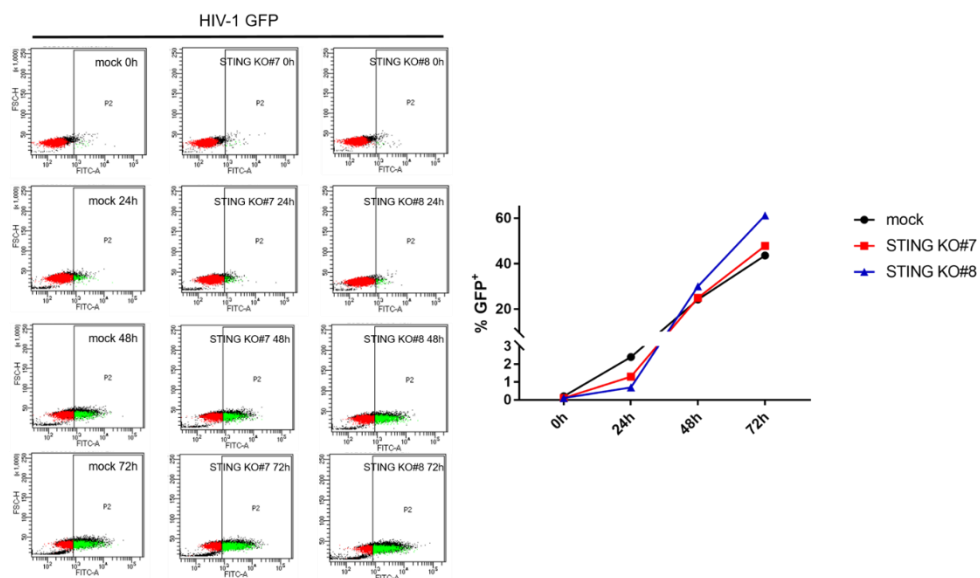


그림 5. STING은 인간면역결핍바이러스 감염 후 다양한 시간대에서도 그 감염성에는 영향을 주지 않는 것을 확인.

인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)의 감염성이 STING에 의해서 조절되는 지 확인하기 위해 HIV 감염 후 다양한 시점에서 표본을 얻었고, 그 감염성을 형광이용세포분류기(fluorescence activated cell sorter, FACS)를 통해서 분석하였다. 왼쪽 그래프는 STING 녹아웃 Hela 세포와 그 대조군 Hela 세포가 12 well plate에 1×10^5 개의 세포가 깔려 있는 상태에서 HIV를 40 ng씩 감염되고 0, 24, 48, 72 시간 뒤 Hela 세포들의 FACS 분석결과이다. 오른쪽 그래프는 왼쪽에서 얻은 FACS 결과를 막대 그래프로 정리한 그림이다.

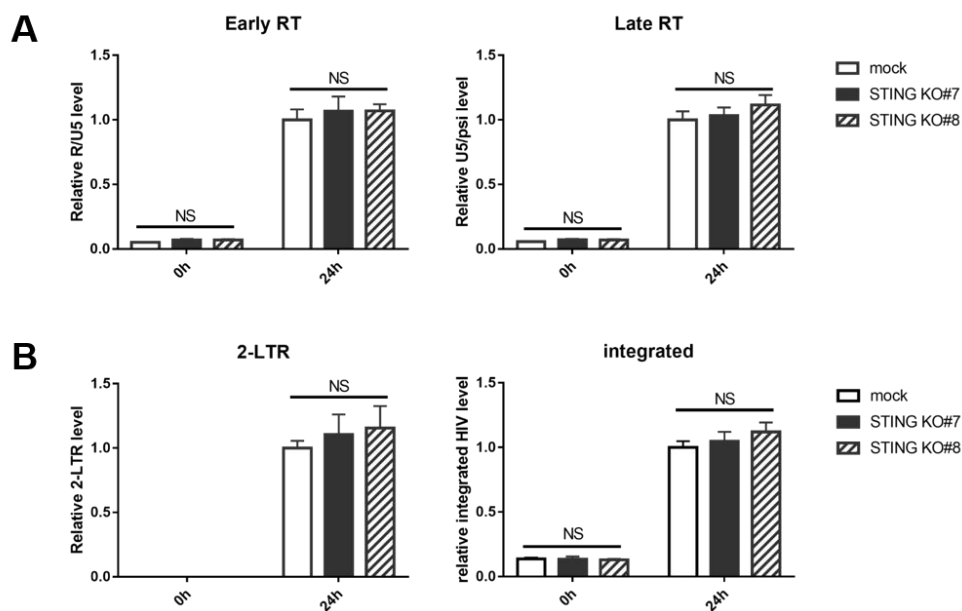


그림 6. STING은 인간면역결핍바이러스 cDNA의 세포핵 침입 과정에 영향이 없음.

인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus, HIV) 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA)가 숙주 세포핵 침입하는 과정에 STING의 영향을 확인하기 위해서 STING 녹아웃 Hela 세포에서 진행한 실험이다. STING 녹아웃 Hela 세포와 그 대조군 Hela 세포에 HIV 감염 후 24 시간 뒤에 DNA를 분리하였다. 이 때 얻은 DNA를 주형으로 실시간연쇄중합반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 통해서 분석한 결과를 정리한 것이다.

(A) HIV의 초기와 후기 역전사 산물들 수준을 STING 녹아웃 Hela 세포와 대조군 Hela 세포에서 비교한 결과이다.

(B) 핵에는 들어왔지만 숙주의 유전체에 들어가지 못한 HIV cDNA인 2-LTR과 숙주의 유전체에 들어간 HIV cDNA 수준을 STING 녹아웃 Hela 세포와 대조군 Hela 세포에서 비교한 결과이다.

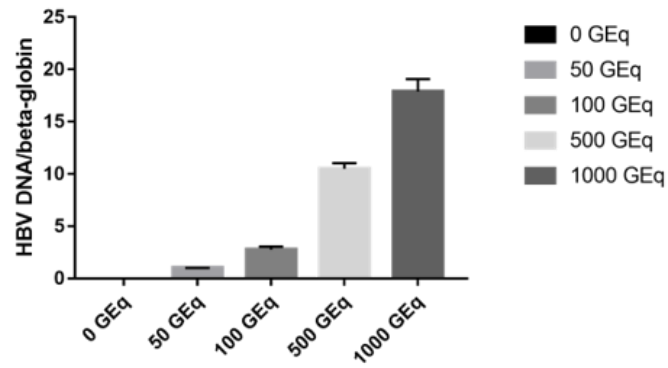
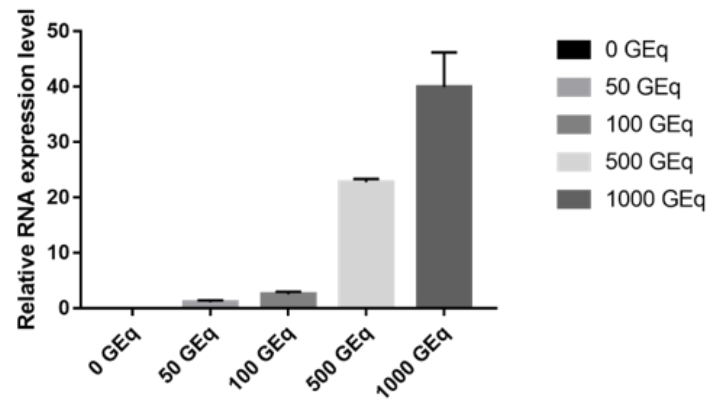
A**HBV DNA****B****3.5 kb vRNA**

그림 7. HepG2-NTCP 세포에서 인간 B형 간염바이러스 감염이 정상적으로 이루어지는 것을 DNA와 RNA 수준에서 확인.

인간 B형 간염바이러스(human hepatitis B virus, HBV)의 감염 모델인 HepG2-NTCP 세포에 대한 검증과정이다. HBV를 0, 50, 100, 500, 1000 Genome equivalent per cell(GEq)로 감염을 해준 뒤 하루 뒤에 DNA와 RNA 표본을 얻어서 실시간중합연쇄반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 통해서 분석한 결과이다.

(A) DNA 표본을 주형으로 하여 HBV DNA 수준을 qRT-PCR을 통해서 관찰한 결과이다.

(B) RNA 표본을 역전사 과정을 통해 상보적 DNA로 만들어 주고 이를 주형으로 사용하여 HBV 3.5 kb vRNA 발현 수준을 qRT-PCR을 통해서 관찰한 결과이다.

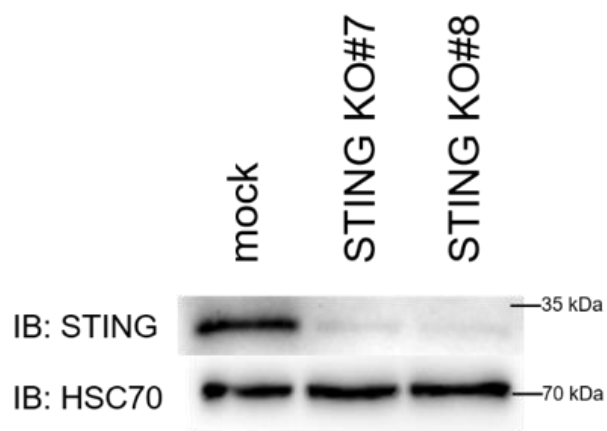
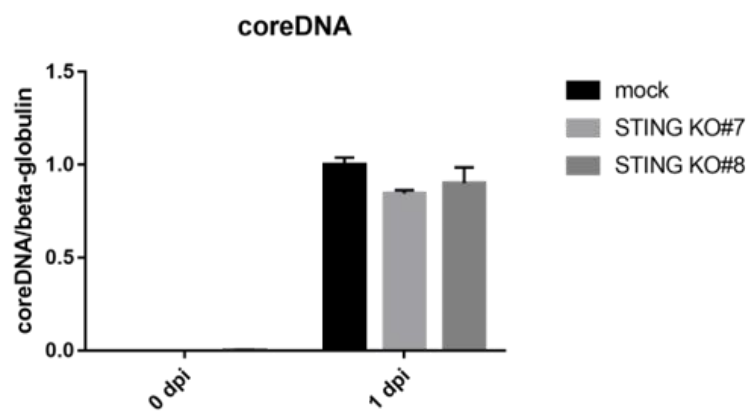
A**B**

그림 8. CRISPR-Cas9을 통한 STING 녹아웃 HepG2-NTCP 세포에서 인간 B형 간염바이러스의 세포침입과정에는 영향이 없음을 확인.

CRISPR-Cas9을 통해서 HepG2-NTCP 세포에서 STING 녹아웃 세포를 제작 후 단백질 발현양을 통해 이를 확인하였고, 이 세포들을 이용해서 STING이 HBV DNA의 핵 침입 과정 이전에 주는 영향에 대해서 확인하는 과정이다.

(A) 웨스턴 블롯을 통해서 STING의 단백질 수준 변화를 CRISPR-Cas9을 통해 만든 STING 녹아웃 HepG2-NTCP 세포에서 확인하였다.

(B) 인간 B형 간염바이러스(human hepatitis B virus, HBV)를 500 Genome equivalent per cell (500 GEq)로 감염해주고 하루 뒤 DNA 표본을 얻어서 이를 주형으로 실시간연쇄증합반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 진행해 HBV DNA 수준을 STING 녹아웃 HepG2-NTCP 세포와 대조군 HepG2-NTCP 세포에서 비교 관찰한 결과이다.

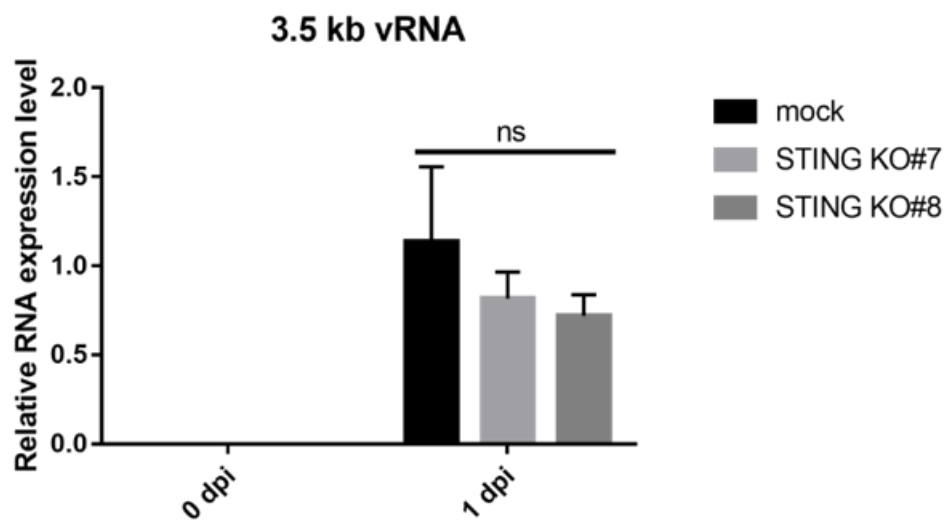


그림 9. STING이 인간 B형 간염바이러스 감염 초기에 바이러스 mRNA 수준에
는 영향을 주지 않는 것을 확인.

STING 녹아웃 HepG2-NTCP 세포와 대조군 HepG2-NTCP 세포에 인간 B
형 간염바이러스(human hepatitis B virus, HBV)를 500 genome equivalent
per cell(GEq)로 감염해주고 하루 뒤에 RNA 표본을 얻었다. 이 때 얻은 RNA
표본으로 역전사 과정 진행해서 상보적 DNA를 얻고 이 상보적 DNA를 주형으
로 실시간연쇄증합반응(quantitative real-time polymerase chain reaction,
qRT-PCR)을 진행해서 HBV 3.5 kb vRNA 발현 수준을 비교한 결과이다. 세
번의 독립적인 실험결과를 Prism version 5.0 software(GraphPad Software)
를 이용해서 분석했다. 모든 값은 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 으로 표현되었고, Two-way
ANOVA 방법을 통해 $P < 0.05$ 에서 차이의 중요도를 결정하였다

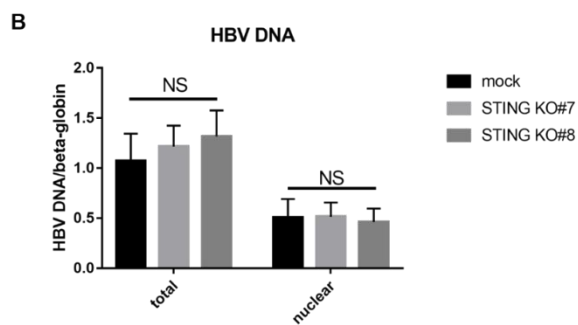
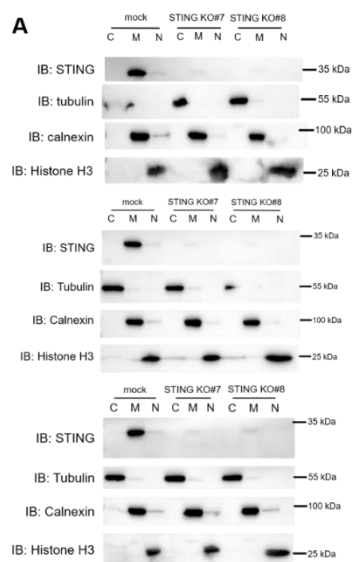


그림 10. STING은 인간 B형 간염바이러스 DNA의 세포핵 침입 과정에 영향을 주지 않는 것을 DNA 수준에서 확인.

STING이 인간 B형 간염바이러스(human hepatitis B virus, HBV) DNA의 세포핵 침입 과정에 주는 영향을 알아보기 위해 STING 녹아웃 HepG2-NTCP 세포와 대조군 HepG2-NTCP 세포에 HBV를 500 Genome equivalent per cell(500 GEq)로 감염해주고, 하루 뒤에 초원심세포분획법으로 각 세포들을 세포질(cytosol, C), 막(membrane, M), 그리고 핵(nuclear, N)으로 분획 지어주었다. 그리고 이 분획된 표본들을 이용해서 분석을 진행하였다.

(A) 분획된 표본들이 잘 분획된 것인지 확인하기 위해서 분획된 표본들의 단백질들을 웨스턴 블롯 방법으로 확인해 본 것이다. Tubulin을 세포질, calnexin을 막 부분, histone H3를 핵 부분 표지로 사용하였다. 총 세 번의 실험을 진행하였고 각각의 경우에 대한 결과를 모두 제시하였다.

(B) 분획된 STING 녹아웃 HepG2-NTCP 세포에서 전체 부분과 핵 부분에서 DNA 표본을 얻고 이를 주형으로 실시간중합연쇄반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 진행한 결과이다. 세 번의 독립적인 실험결과를 Prism version 5.0 software(GraphPad Software)를 이용해서 분석했다. 모든 값은 mean±SEM으로 표현되었고, Two-way ANOVA 방법을 통해 $P < 0.05$ 에서 차이의 중요도를 결정하였다

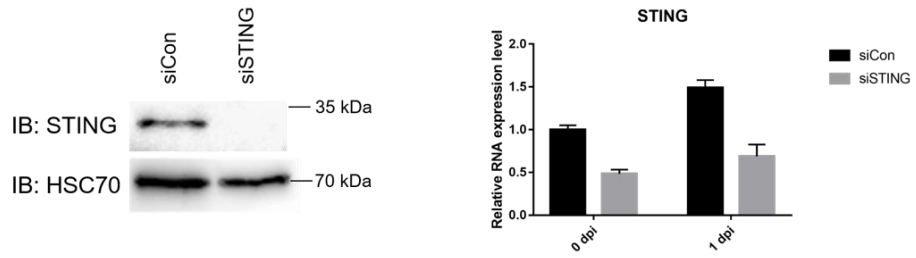
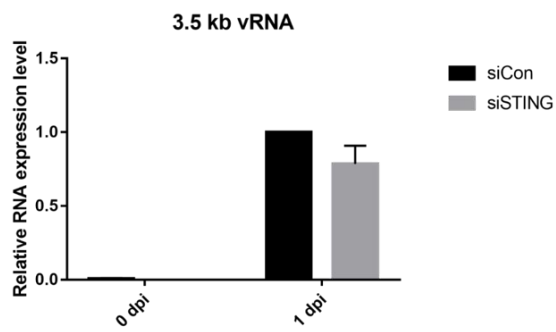
A**B**

그림 11. siRNA를 통한 STING 발현 저하와 STING의 발현 저하가 인간 B형 간염바이러스 mRNA 수준에는 영향이 없는 것을 확인.

STING이 HepG2-NTCP 세포에서 siRNA를 통해 발현이 저하되었을 때에도 CRISPR-Cas9으로 STING을 HepG2-NTCP 세포에서 낙아웃 했을 때와 유사한 결과가 관찰되는 지 확인하기 위해서 진행한 실험이다.

(A) 왼쪽 결과는 siRNA를 HepG2-NTCP 세포에 처리를 하고 3일 뒤에 인간 B형 간염바이러스(human hepatitis B virus, HBV)를 감염시키기 전에 세포를 이용해서 웨스턴 블롯을 진행해서 감염되기 전에 STING 단백질 발현 수준이 잘 저하 되어있다는 것을 확인하였다. 오른쪽 결과는 HepG2-NTCP 세포에 siRNA 처리 3일 후 HBV를 500 Genome equivalent per cell(500 GEq)로 감염시킨 세포와 안 시킨 세포에서 RNA 표본을 얻어 상보적 DNA로 역전사 시켜주고 이 상보적 DNA를 주형으로 사용해 실시간연쇄중합반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)을 통해서 STING의 RNA 발현 수준을 확인한 결과이다.

(B) HepG2-NTCP 세포에 siRNA 처리 3일 후 HBV를 500 GEq로 감염시킨 세포와 안 시킨 세포에서 RNA 표본을 얻어 상보적 DNA로 역전사 시켜주고 이 상보적 DNA를 주형으로 사용해 qRT-PCR 분석으로 HBV의 3.5 kb vRNA 발현 수준을 비교한 결과이다.

V. 참고문헌

1. Balka, K. R., C. Louis, T. L. Saunders, A. M. Smith, D. J. Calleja, D. B. D'Silva, F. Moghaddas, M. Tailler, K. E. Lawlor, Y. Zhan, C. J. Burns, I. P. Wicks, J. J. Miner, B. T. Kile, S. L. Masters and D. De Nardo (2020). "TBK1 and IKK ϵ Act Redundantly to Mediate STING-Induced NF- κ B Responses in Myeloid Cells." Cell Rep **31**(1): 107492.
2. Brussel, A. and P. Sonigo (2003). "Analysis of early human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis by use of a new sensitive assay for quantifying integrated provirus." J Virol **77**(18): 10119–10124.
3. Campbell, E. M. and T. J. Hope (2015). "HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection." Nat Rev Microbiol **13**(8): 471–483.
4. E, X., P. Meraner, P. Lu, J. M. Perreira, A. M. Aker, W. M. McDougall, R. Zhuge, G. C. Chan, R. M. Gerstein, P. Caposio, A. D. Yurochko, A. L. Brass and T. F. Kowalik (2019). "OR14I1 is a receptor for the human cytomegalovirus pentameric complex and defines viral epithelial cell tropism." Proc Natl Acad Sci U S A **116**(14): 7043–7052.

5. Fay, N. and N. Panté (2015). "Nuclear entry of DNA viruses." Frontiers in Microbiology **6**(467).
6. Fernandez, J., A. K. Machado, S. Lyonnais, C. Chamontin, K. Gartner, T. Leger, C. Henriquet, C. Garcia, D. M. Portilho, M. Pugniere, L. Chaloin, D. Muriaux, Y. Yamauchi, M. Blaise, S. Nisole and N. J. Arhel (2019). "Transportin-1 binds to the HIV-1 capsid via a nuclear localization signal and triggers uncoating." Nat Microbiol **4**(11): 1840–1850.
7. Herrscher, C., F. Pastor, J. Burlaud-Gaillard, A. Dumans, F. Seigneuret, A. Moreau, R. Patient, S. Eymieux, H. de Rocquigny, C. Hourieux, P. Roingeard and E. Blanchard (2020). "Hepatitis B virus entry into HepG2-NTCP cells requires clathrin-mediated endocytosis." Cell Microbiol: e13205.
8. Ishikawa, H., Z. Ma and G. N. Barber (2009). "STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity." Nature **461**(7265): 788–792.
9. Kalamvoki, M. and B. Roizman (2014). "HSV-1 degrades, stabilizes, requires, or is stung by STING depending on ICP0, the US3 protein kinase, and cell derivation." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(5): E611–E617.

10. Kilcher, S. and J. Mercer (2015). "DNA virus uncoating." Virology **479–480**: 578–590.
11. Li, X., J. Zhao, Q. Yuan and N. Xia (2017). "Detection of HBV Covalently Closed Circular DNA." Viruses **9**(6).
12. Lusic, M. and R. F. Siliciano (2017). "Nuclear landscape of HIV–1 infection and integration." Nat Rev Microbiol **15**(2): 69–82.
13. Megahed, F. A. K., X. Zhou and P. Sun (2020). "The Interactions between HBV and the Innate Immunity of Hepatocytes." Viruses **12**(3).
14. Ndung'u, T., J. M. McCune and S. G. Deeks (2019). "Why and where an HIV cure is needed and how it might be achieved." Nature **576**(7787): 397–405.
15. Ojala, P. M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay and A. Helenius (2000). "Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro." Mol Cell Biol **20**(13): 4922–4931.
16. Quinto, I., M. Mallardo, F. Baldassarre, G. Scala, G. Englund and K. T. Jeang (1999). "Potent and stable attenuation of live–HIV–1 by gain of a proteolysis–resistant inhibitor of NF–kappaB (IkappaB–alphaS32/36A) and the implications for vaccine

- development." J Biol Chem **274**(25): 17567–17572.
17. Rabe, B., A. Vlachou, N. Pante, A. Helenius and M. Kann (2003). "Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(17): 9849–9854.
 18. Stempel, M., B. Chan, V. Juranić Lisnić, A. Krmpotić, J. Hartung, S. R. Paludan, N. Füllbrunn, N. A. Lemmermann and M. M. Brinkmann (2019). "The herpesviral antagonist m152 reveals differential activation of STING–dependent IRF and NF- κ B signaling and STING's dual role during MCMV infection." Embo j **38**(5).
 19. Sutton, R. E., H. T. Wu, R. Rigg, E. Bohnlein and P. O. Brown (1998). "Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells." J Virol **72**(7): 5781–5788.
 20. Trotard, M., N. Tsopoulidis, N. Tibroni, J. Willemsen, M. Binder, A. Ruggieri and O. T. Fackler (2016). "Sensing of HIV–1 Infection in Tzm–bl Cells with Reconstituted Expression of STING." Journal of Virology **90**(4): 2064–2076.
 21. Winer, B. Y. and A. Ploss (2015). "Determinants of hepatitis B and delta virus host tropism." Curr Opin Virol **13**: 109–116.

22. Wu, K., A. Oberstein, W. Wang and T. Shenk (2018). "Role of PDGF receptor- α during human cytomegalovirus entry into fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **115**(42): E9889–e9898.
23. Zevini, A., D. Olganier and J. Hiscott (2017). "Crosstalk between Cytoplasmic RIG-I and STING Sensing Pathways." Trends Immunol **38**(3): 194–205.

Abstract

Investigating the function of STING as a regulating factor for virus uncoating process

Seowoo Park

School of Biological science

The Graduate School

Seoul National University

In the virus infection cycle, the process by which the genome of the virus is transferred from the viral capsid to the host cell is a very important process, and this process is called virus uncoating. If this uncoating process is not performed well, the expression of viral genes is not normally performed, and as a result, the production of progeny virus is inhibited. Therefore, if we understand the virus uncoating process well, we can get good information to prevent virus infection. Our laboratory previously discovered that the interferon response modulator protein STING (Stimulator of interferon gene) is

a uncoating regulating factor in the early stages of herpesvirus infection. In general, STING is well known as an antiviral protein that modulates the interferon response when double-stranded DNA stimulation comes, but some studies have also reported that STING shows proviral function in the early stages of viral infection. Our laboratory showed that this proviral function of STING is achieved by regulating the virus uncoating process, and this was a new discovery, so we wanted to check whether STING's uncoating regulator function also occurs in other viral infections. Among several viruses I chose the human immunodeficiency virus (HIV) and the human hepatitis B virus (HBV), which are globally causing chronic infection problems, to check if STING can function as regulator of the uncoating process. As a result of this study, in the case of HIV, when STING was knocked out, there was no difference in the HIV infectivity and the nuclear invasion process of the HIV complementary DNA, and also in the case of HBV, when STING was knocked out, there was no significant difference in the amount of HBV gene expression and the nuclear invasion process of the HBV genome in the initial infection situation. Therefore, we revealed that proviral function of STING as an uncoating regulator is not seen in HIV and HBV infections. Based on the results of this study, it will be possible to evaluate the versatility of STING as a regulator of the virus uncoating process and will be information that can be used to develop a method for preventing virus infection.

Keyword: virus uncoating, HIV, HBV, STING

Student number: 2017–29455